

Kandungan Xantofil Daun Lamtoro (*Leucaena leucocephala*) Hasil Detoksikasi Mimosin Secara Fisik dan Kimia

Lamtoro Leaf (*Leucaena leucocephala*) Xanthophylls Content as the Result of Physical and Chemical Detoxification of Mimosine

E. B. Laconi^{a*} & T. Widiyastuti^b

^aDepartemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

^bFakultas Peternakan, Universitas Jenderal Soedirman
Jln. Suparno No. 110 Karangwangkal Purwokerto 53123
(Diterima 27-01-2010; disetujui 12-04-2010)

ABSTRACT

Leucaena (*Leucaena leucocephala*) is a feed source which has high protein and carotenoid, but its utilization as feed was limited by the presence of mimosine (β -N-(3-Hydroxy-4 pyridone)- α amino propenoic acid as a toxin. Experiment was carried out using completely randomized design with 4 detoxification treatments and 5 replications. Detoxification treatments of leucaena leaf consisted of (1) non treated leucaena leaf, (2) steamed heating at 70 °C for 15 minutes, (3) dry heating at 70 °C for 12 h, (4) soaking with fresh water for 12 h, (5) spray with NaOH 5%, incubated for 12 h. Variables measured were mimosine and xanthophylls contents. Data were analyzed using analysis of variance and duncan multiple range test was further done to test the significant differences between means. The results showed that soaking leucaena leaf with fresh water for 12 h gave the highest reduction for both mimosine and xanthophylls contents and steamed heating at 70°C for 15 minutes had the highest xanthophylls content post detoxification. It was concluded that steamed heating at 70°C for 15 minutes was the best detoxification methods for mimosine in leucaena leaf.

Key words: mimosine, *Leucaena leucocephala*, physical and chemical detoxification

PENDAHULUAN

Lamtoro (*Leucaena leucocephala*) merupakan salah satu leguminosa pohon yang mengandung protein tinggi dan karotenoid yang sangat potensial sebagai pakan ternak non ruminansia seperti unggas di daerah tropis. Tanaman lamtoro menghasilkan bahan kering sebesar 6–8 ton per hektar per tahun atau sekitar 20–80 ton bahan segar dan kandungan protein kasar hijauan lamtoro cukup tinggi berkisar 25%–30% (NAS, 1984). Komposisi asam amino daun lamtoro hampir seimbang dengan tepung ikan, kecuali lisina dan metionina yang lebih rendah, karena daun lamtoro mengandung mimosin sebagai asam amino beracun. Apabila dibandingkan dengan bungkil kacang kedelai, kecuali asam glutamat, kandungan asam amino lainnya cukup seimbang. Daun lamtoro merupakan sumber vitamin A dengan kandungan β -karoten tinggi dan mempunyai kandungan xantofil

lebih tinggi dibandingkan jagung kuning sebagai sumber pigmentasi pada kulit dan kuning telur unggas. Dedaunan leguminosa pohon banyak mengandung senyawa fenolik dalam konsentrasi yang tinggi, khususnya tanin dan mimosin seperti halnya daun lamtoro (Jayanegara & Sofyan, 2008).

Mimosin merupakan golongan asam amino aromatik dengan rumus kimia (β -N-(3-hydroxy-4-pyridone)- α -amino-propenoic acid). Mimosin terdapat pada biji dan daun spesies *Leucaena*, kandungannya pada daun lamtoro berkisar antara 1,40–7,19 g/100g bahan kering yang lebih tinggi dibandingkan dengan seluruh hijauan, yaitu antara 0,70–3,59 g/100g (D'Mello, 2000). Mimosin adalah asam amino non protein yang mempunyai struktur hampir sama dengan tirosin, serta terdapat pada beberapa spesies mimosa dalam genus *Leucaena*. Kandungan mimosin daun lamtoro berkisar 2%–6% dan bervariasi tergantung dengan tingkat kematangannya.

Penggunaan lamtoro untuk ternak unggas dan babi terbatas karena adanya mimosin dan produk degradasi primernya, yaitu 3-hydroxy, 4 (1H) pyridine (DHP) yang beracun bagi ternak (Aung *et al.*, 2006) yang dapat mempengaruhi produktivitasnya, seperti kehilangan rambut dan "wool" pada ternak non ruminan (Kumar,

*Korespondensi:
Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan,
Institut Pertanian Bogor,
Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680
e-mail: elaconi@yahoo.com

2003). Mimosin (β -N-(3-hydroxy-4-pyridone) mengandung senyawa polifenol yang tinggi termasuk tanin akan mengikat protein, sehingga protein menjadi tidak "tersedia" untuk ternak dan menyebabkan efek negatif terhadap palatabilitas, pencernaan, dan pertumbuhan. Mimosin akan mempengaruhi sintesis dan atau fungsi protein dalam mengatur translasi mRNA yang menyebabkan penghambatan replikasi DNA (Wang *et al.*, 2000). Mimosin sebagai asam amino non protein dalam daun lamtoro dengan produk pemecahannya adalah senyawa 3-hydroxy-4(1H)-pyridone (DHP) mempunyai struktur hampir sama dengan asam amino tirosin. Mimosin pada tingkat molekul akan berfungsi sebagai antagonis tirosin yang dapat menghambat kerja tirosin dan kegunaan enzim (Haque *et al.*, 2008). Secara umum efek negatif mimosin adalah kehilangan nafsu makan, pembesaran kelenjar gondok, performa reproduksi buruk, menekan pertumbuhan, dan kematian post-natal.

Mimosin dapat menyebabkan defisiensi glisina, salah satu asam amino esensial bagi unggas, untuk mensintesis asam empedu sehingga absorpsi lemak menurun yang pada akhirnya akan menyebabkan defisiensi vitamin dan pigmen larut lemak. Hal ini diduga dapat menghambat deposisi pigmen pada jaringan unggas sehingga pigmentasi tidak tercapai. Upaya detoksifikasi mimosin daun lamtoro dapat dilakukan dengan pemanasan, perendaman, penambahan garam sulfat, penyemprotan dengan alkali, penambahan senyawa analog mimosin, pencucian, dan rekayasa genetik untuk mendapatkan varietas baru yang rendah mimosin. Biodegradasi senyawa polifenol yang terkandung dalam mimosin dapat ditingkatkan dengan perlakuan kimia asam dan alkali (Yosef & Ben-Ghedalia, 2000).

Daun lamtoro mengandung xantofil hampir dua kali lipat rumput, namun ketersediaan pigmen pada tepung daun lamtoro hanya setengah dari tepung rumput, hal ini diduga adanya mimosin dan tanin yang menurunkan ketersediaan xantofil. Pengolahan dengan pemanasan dan penggunaan sejumlah air dapat mengurangi kandungan β -karoten, protein, karbohidrat, dan vitamin larut air. Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh metode detoksifikasi yang tepat sehingga diperoleh daun lamtoro yang tidak atau sedikit mengandung mimosin dengan reduksi kadar xantofil minimal.

MATERI DAN METODE

Metode Detoksifikasi Mimosin

Daun lamtoro varietas K28 yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Lapang Agrostologi Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto. Berbagai metode detoksifikasi mimosin dilakukan pada tahap ini, yaitu detoksifikasi fisik dan kimia yang terdiri atas: D0=daun lamtoro tanpa perlakuan, D1=pemanasan lembab (steamed cooking) pada suhu 70 °C selama 15 menit, D2=pemanasan kering (dry heating) pada suhu 70 °C selama 12 jam, D3=perendaman dalam air selama 12 jam, dan D4=penyemprotan dengan larutan NaOH 5% inkubasi selama 12 jam.

Pemanasan lembab (steamed cooking) (D1). Dua

ratus gram daun lamtoro segar dimasukkan ke dalam kantong plastik kemudian dipanaskan dalam penangas air pada suhu 70 °C selama 15 menit. Setelah itu reaksi dihentikan dengan mengangin-anginkan (Lowry *et al.*, 1983).

Pemanasan kering (dry heating) (D2). Dua ratus gram daun lamtoro segar diratakan di atas kertas karton, kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 70 °C selama 12 jam (Murthy *et al.*, 1994).

Perendaman dalam air selama 12 jam (D3). Dua ratus gram daun lamtoro segar direndam dalam 1000 ml air, dibiarkan pada suhu kamar selama 12 jam, setelah itu disaring dengan kain, selanjutnya diangin-anginkan (Murthy *et al.*, 1994).

Penyemprotan dengan larutan NaOH 5% inkubasi selama 12 jam (D4). Dua ratus gram daun lamtoro disemprot dengan larutan NaOH 5% sampai basah merata, inkubasi pada suhu kamar selama 12 jam. Reaksi kemudian dihentikan dengan menambahkan HCl pekat hingga konsentrasi akhir 0,1 N (Murthy *et al.*, 1994).

Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati adalah penurunan kadar mimosin dengan metode *high performance liquid chromatography* (HPLC) (Lowry *et al.*, 1983) dan kadar xantofil daun lamtoro dengan metode HPLC (Haq *et al.*, 1996).

Penurunan kadar mimosin (metode HPLC). Penurunan kadar mimosin diukur dengan menganalisa daun lamtoro segar sebelum perlakuan detoksifikasi dan setelah detoksifikasi. Preparasi sampel dilakukan menurut Lowry *et al.* (1983), yaitu daun lamtoro segar direndam dalam N_2 cair, kemudian dikeringkan dengan *freeze dryer* selama 24 jam. Daun yang sudah kering kemudian digiling dengan ukuran 100 mesh, 25 mg daun yang sudah digiling diekstrak dengan 25 ml 0,1 HCl dengan *blender* selama 2 menit. Campuran kemudian disentrifus pada kecepatan 3000 x g selama 10 menit. Supernatan disaring dengan ultrafiltration sel (Model 52 Amicon) menggunakan diameter diaflo membran PM10 43 mm atau *membrane cone* CF di bawah sentrifus pada kecepatan 100 x g selama 10 menit. Supernatan (10 μ l) siap diinjeksikan ke dalam kolom HPLC. Standar mimosin dibuat dengan melarutkan 10 μ g/ml dalam air yang diasamkan dengan ortofosforik (0,2 ml/100 ml).

Kadar xantofil daun lamtoro. Kadar xantofil diukur dengan menganalisa daun lamtoro segar sebelum detoksifikasi mimosin dengan metode HPLC (Haq *et al.*, 1996). Preparasi sampel dilakukan dengan menggiling dan menyaring daun lamtoro yang sudah dikering-anginkan (ukuran 40 sieve). Satu gram sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, ditambahkan 30 ml ekstrak (heksana-etanol-aseton-toluena, dengan perbandingan (10+7+7+6), labu ukur kemudian dialiri nitrogen ditutup, kemudian digoyang selama 1 menit. Selanjutnya, disimpan dalam ruang gelap selama semalam (\pm 16 jam).

Tahap selanjutnya adalah saponifikasi untuk menghilangkan karotenoid ester, yaitu dengan menambahkan 2 ml KOH 40%, dialiri dengan nitrogen, ditutup kemudian divortek. Biarkan dalam tempat gelap selama semalam. Kemudian ditambah 30 ml heksana, dialiri nitrogen dan digoyang. Setelah itu ditambah dengan 10% Na₂SO₄ sampai ± 80% labu ukur penuh, kemudian dialiri nitrogen dan divortek selama 30 detik. Setelah itu ke dalam labu ditambahkan lagi Na₂SO₄ 10% hingga tanda (100 ml), dialiri nitrogen, dibiarkan dalam ruang gelap selama 1 jam untuk memisahkan heksana-toluen. Setelah pemisahan selama 1 jam 10 ml bagian atas larutan dipipet dan dipindahkan ke dalam botol bertutup (ukuran 16x125 mm). Larutan kemudian dievaporasi di bawah *nitrogen evaporator block* pada suhu 37°C. Selanjutnya sampel siap diinjeksikan ke HPLC dengan sebelumnya melarutkan dalam 2 ml larutan asetronitril-diklorometan-metanol (65:25:10) (juga sebagai fase mobil) dengan laju aliran 1 ml/menit, kolom yang digunakan adalah VYDAC: *Reverse Phase* C18 pada panjang gelombang 455 nm.

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan detoksifikasi dan 5 ulangan untuk setiap perlakuan, sehingga terdapat 20 unit percobaan. Data dianalisa menggunakan analisis varian (Anova) dan bila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (Steel & Torrie, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Mimosin Daun Lamtoro

Hasil penelitian menunjukkan kadar mimosin daun lamtoro varietas K28 adalah 6,77% BK. Hal ini sesuai dengan laporan Bray (1993) bahwa konsentrasi mimosin dalam *L. leucocephala* adalah berkisar antara 2,61%-9,40%. Perlakuan detoksifikasi (fisik dan kimia) berpengaruh sangat nyata ($P < 0,05$) terhadap penurunan kadar mimosin daun lamtoro (Tabel 1). Penurunan kadar mimosin dengan perlakuan fisik perendaman dalam air selama 12 jam (D3) berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan detoksifikasi lainnya (D1, D2, D4), sedangkan perlakuan fisik D1 dan D2 tidak berbeda dengan D4.

Dibandingkan dengan perlakuan pemanasan (lembab dan kering) dan penyemprotan NaOH 5%, perlakuan perendaman pada penelitian ini menghasilkan penurunan terbesar. Hal ini sesuai dengan laporan Penafiorida *et al.* (1992) yang menyatakan bahwa perendaman daun lamtoro selama 30–48 jam dapat menurunkan mimosin hingga 90%. Biji dan daun lamtoro mengandung enzim yang dapat merombak mimosin menjadi dihidroksi piridina (DHP), piruvat, dan amonia. Jika lamtoro direndam dalam air sebanyak dua kali lipat berat lamtoro pada suhu 30 °C, konversi mimosin menjadi DHP akan berlangsung secara cepat. Perubahan separuhnya akan terjadi pada menit ke-7 dan perubahan hampir seluruhnya terjadi setelah 30 menit. Setelah 60 menit penurunan mimosin dan kenaikan DHP mem-

punyai hubungan lebih dari 95%. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada indikasi kehilangan atau penurunan mimosin dengan jalur lain atau reaksi lanjut dari DHP, sedangkan pada suhu 45 °C perubahan separuhnya terjadi pada menit ke-4. Semakin tinggi temperatur perendaman maka perombakan mimosin menjadi DHP akan semakin cepat. Disebutkan pula bahwa suhu optimal untuk terjadinya perombakan pada metode tersebut adalah 75 °C. Suhu lebih dari itu dinyatakan tidak efektif.

Perendaman pada penelitian ini menghasilkan reduksi mimosin sebesar 51,24% (kadar mimosin 6,77% BK menjadi 3,30% BK). Hal ini disebabkan perendaman dilakukan pada suhu kamar, yaitu suhu pada saat penelitian hanya berkisar antara 18-19 °C, sehingga diduga perombakan mimosin berlangsung lebih lambat. Pengamatan selama proses detoksifikasi perendaman mampu menurunkan mimosin tertinggi, akan tetapi perendaman dalam jangka waktu yang lebih lama (lebih dari 12 jam) diduga dapat menurunkan kandungan nutrisi yang lain, yang dibuktikan dengan lebih cepat membusuknya daun selama proses menganginkan.

Perlakuan D1 dan D2 menghasilkan penurunan mimosin lebih rendah dibanding perlakuan D3. Hal ini diduga karena hidrolisis mimosin berlangsung lebih lambat dan aktivitas enzim yang merombak mimosin terutama menjadi DHP terhenti dengan adanya panas. Pengolahan detoksifikasi, seperti pemanasan kering, pemanasan basah, ekstraksi dengan air, dan penambahan pakan suplemen, dapat menurunkan konsentrasi antinutrisi dalam pakan seperti mimosin pada daun lamtoro (Francis *et al.*, 2001). Penambahan pakan suplemen melalui pencampuran daun-daun segar, seperti (*Gliricidia sepium*–*L. leucocephala*–*Calliandra calothyrsus*) atau campuran tepung daun (*L. leucocephala*–*M. alba*–*Tectona grandis*) telah berhasil dengan baik sebagai salah satu strategi suplementasi pakan dalam ransum sapi dan kambing (Yusran & Teleni, 2000; Anbarasu *et al.*, 2001). Kandungan mimosin akan berkurang secara proporsional dengan jumlah air perendaman (Xuan *et al.*, 2006).

Tabel 1. Kadar mimosin daun lamtoro hasil perlakuan detoksifikasi

Perlakuan	Mimosin (%BK)	Reduksi (%)
Daun lamtoro tanpa perlakuan (D0)	6,77±0,40 ^a	-
Pemanasan lembab, suhu 70 °C, 15 menit (D1)	4,27±0,59 ^b	36,90±8,67 ^b
Pemanasan kering, suhu 70 °C, 12 jam (D2)	4,87±0,61 ^b	28,06±9,02 ^b
Perendaman dalam air selama 12 jam (D3)	3,30±0,40 ^c	51,24±5,90 ^a
Penyemprotan dengan NaOH 5% inkubasi 12 jam (D4)	4,82±0,62 ^b	28,71±9,18 ^b

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).

Hal senada juga diungkapkan oleh (Kumar, 2003) bahwa efek mimosin dari daun lamtoro dapat diturunkan dengan perlakuan panas, atau dengan suplementasi ion-ion besi seperti Fe^{2+} , Al^{3+} dan Zn^{2+} . Hidrolisis mimosin akan menjadi lebih lambat jika tidak ada penambahan air atau jika ditambah air dalam jumlah yang sangat besar (20 : 1). Aktivitas enzim yang merombak mimosin menjadi DHP akan terhambat dengan penambahan HgCl_2 , dilusi dalam asam mineral, dikeringbekukan (freeze dried), kering udara (air dried), dan direndam dalam air panas. Konversi parsial mimosin menjadi DHP pada pemanasan atau pengeringan dipengaruhi oleh dua faktor, yaitu: 1) rusaknya membran sel (sehingga mengakibatkan kontak enzim dan substrat), 2) denaturasi sistem enzim. Hasil penelitian (Soedarjo & Borthakur, 1996) menyatakan bahwa perendaman dalam air selama 24 jam dapat mengeliminasi 97% mimosin dari daun muda, kulit dan biji lamtoro, serta lebih dari 20% mimosin dari seluruh biji lamtoro muda tanpa nyata menurunkan kandungan protein terlarut.

Kadar Xantofil Daun Lamtoro

Lamtoro kaya pigmen karotenoid, seperti xantofil, kandungannya lebih tinggi dari jagung. Kadar xantofil daun lamtoro sebelum detoksifikasi pada penelitian ini adalah $888,72 \pm 61,54$ mg/kg BK. Kadar xantofil daun lamtoro sebelum dan sesudah detoksifikasi berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) (Tabel 2). Terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) antara daun lamtoro tanpa detoksifikasi dan yang didetoksifikasi (D0 dan D1, D2, D3, D4). Detoksifikasi fisik (D1) berbeda nyata dengan D2 dan D3 ($P < 0,01$) di antara perlakuan, sedangkan antara perlakuan fisik dan kimia hanya D1 yang berbeda nyata ($P < 0,01$) dengan D4. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan detoksifikasi selain mampu menurunkan mimosin juga mengakibatkan turunnya kandungan xantofil daun lamtoro, dengan besarnya reduksi bervariasi. Reduksi kadar xantofil tertinggi adalah pada perlakuan D3 sebesar 53,89%, sedangkan reduksi kadar xantofil terkecil adalah 36,70% pada perlakuan D1 (Tabel 2).

Pengolahan dengan pemasakan dan penggunaan sejumlah air dapat mengakibatkan kerusakan pada

bahan yang banyak mengandung β -karoten, disamping nutrien lain seperti protein, vitamin larut air, dan karbohidrat. Xantofil yang terkandung pada daun lamtoro dan bahan-bahan alamiah lainnya bersifat kurang stabil dan akan terdegradasi oleh perlakuan panas, asam, basa, dan oksidasi (Sotolu & Faturoti, 2008). Ditinjau dari segi kuantitas, terjadi reduksi kadar xantofil daun lamtoro dengan adanya perlakuan detoksifikasi, akan tetapi kandungan xantofil daun lamtoro tersebut masih lebih tinggi bila dibandingkan dengan sumber pigmentasi yang lain, seperti jagung kuning maupun alfalfa dengan kadar xantofil sekitar 300 mg/kg. Efektivitas daun lamtoro sebagai sumber protein kasar bagi ternak memerlukan teknologi pengolahan detoksifikasi yang tepat untuk menurunkan kandungan mimosin tanpa mengurangi xantofil yang tinggi. Mimosin mempunyai efek negatif bagi ternak akan tetapi dapat bermanfaat sebagai bio-pestisida bagi bidang pertanian (Xuan *et al.*, 2006), melalui kemungkinan mudahnya didegradasi setelah penetrasi dalam tanah oleh faktor-faktor tanah, seperti nutrien, pH, mineral, dan mikroba tanah.

KESIMPULAN

Detoksifikasi secara fisik dan kimia mampu menurunkan kandungan mimosin daun lamtoro. Perendaman daun lamtoro selama 12 jam dalam air pada suhu kamar dapat mereduksi kandungan mimosin lebih dari 50%, akan tetapi kandungan xantofil juga menurun lebih dari 50%. Pengolahan yang terbaik untuk menurunkan kandungan mimosin daun lamtoro dengan reduksi kandungan xantofil terendah, yaitu pemanasan lembab dengan suhu 70 °C, selama 15 menit dapat menurunkan kandungan mimosin 36,90% dan reduksi xantofil 36,70%.

DAFTAR PUSTAKA

- Anbarasu, C., N. Dutta, & K. Sharma. 2001. Use of leaf meal mixture as a protein supplement in the ration of goats fed wheat straw. *Animal. Nutr. Feed Technol.* 1: 113-123.
- Aung, A., T. Ngwe, U. ter Meulen, F. Gessler, & H. Böhnelt. 2006. Control of leucaena toxicosis in Myanmar sheep using IBT gottinger-bioreactor grown mimosine degrading ruminal *Klebsiella* spp. Conference on International Agricultural Research for Development, Tropentag.
- Bray, R. A. 1993. Possibility for developing low mimosine leucaena. In: *Leucaena – Opportunities and Limitation*. ACIAR Proc. Series 58: 119-185
- D'Mello, J. P. F. 2000. Antinutritional factors and mycotoxins. In: J. P. F. D'Mello (Ed.). *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. Wallingford, UK, CAB International. P. 383-403.
- Francis, G., H. P. S. Makkar, & K. Becker. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Review article. *Aquaculture* 199: 197-227.
- Haq, A. U., C. A. Bailey, & A. D. Chnna. 1996. Neonatal immune response and growth performance of chicks hatched from single comb White Leghorn breeder fed diets supplemented with β -carotene, canthaxanthin, or lutein. *Poult. Sci.* 74 : 844-851.
- Haque, N., S. Toppo, M. L. Saraswat, & M. Y. Khan. 2008. Effect of feeding *Leucaena leucocephala* leaves and twigs

Tabel 2. Kadar xantofil daun lamtoro hasil perlakuan detoksifikasi

Perlakuan	Xantofil (mg/kg)	Reduksi (%)
Daun lamtoro tanpa perlakuan (D0)	$888,72 \pm 61,54^A$	-
Pemanasan lembab, suhu 70 °C, 15 menit (D1)	$562,56 \pm 40,14^B$	$36,70 \pm 5,56^C$
Pemanasan kering, suhu 70 °C, 12 jam (D2)	$415,86 \pm 70,99^C$	$53,21 \pm 6,27^A$
Perendaman dalam air selama 12 jam (D3)	$409,82 \pm 80,16^C$	$53,89 \pm 7,18^A$
Penyemprotan dengan NaOH 5% inkubasi 12 jam (D4)	$455,59 \pm 39,35^C$	$48,74 \pm 5,11^B$

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda sangat nyata ($P < 0,01$).

- on energy utilization by goats. *J. Anim. Feed Sci. and Technol.* 142: 330–338.
- Jayanegara, A. & A. Sofyan.** 2008. Penentuan aktivitas biologis tannin beberapa hijauan secara *in vitro* menggunakan 'Hohenheim Gas Test' dengan polietilen glikol sebagai determinan. *Med. Pet.* 31:44–52.
- Kumar, R.** 2003. Anti-nutritive factors, the potential risks of toxicity and methods to alleviate them. <http://www.fao.org/DOCREP/003/T0632E/T0632E10.htm>.
- Lowry, J. B., Maryanto, & B. Tangendjaja.** 1983. Autolysins of mimosine to 3-4-hydroxy-4-1(H)pyridone in green tissues of *Leucaena leucocephala*. *J. Sci. Food. Agric.* 34:529–533.
- Murthy, P. S., P. V. V. S. Reddy, A. Venkatramaiah, K. V. S. Reddy, & M. N. Ahmed.** 1994. Methods of mimosine reduction in Subabul leaf meal and its utilization in broiler diet. *Indian Jour. Poult. Sci.* 29:131–137, 15 ref.
- [NAS] National Academy of Sciences.** 1984. *Leucaena: Promising Forage and Tree Crop for the Tropics*. 2nd Edition. National Academy of Sciences, Washington.
- Penafiorida, V. D., F. P. Pascual, & N. S. Tabbu.** 1992. A practical methods of extracting mimosine from ipil-ipil, *Leucaena leucocephala* leaves and its effect on survival and growth of *Penaeus monodon* Juveniles. *Israeli J. Agriculture.* 44: 24–31.
- Soedarjo, M. & D. Borthakur.** 1996. Simple procedures to remove mimosine from young leaves, pods and seeds of *Leucaena leucocephala* used as food. *Intl. J. of Food Sci. and Technol.* 31:97–103.
- Sotolu, A. O. & E. O. Faturoti.** 2008. Digestibility and nutritional values of different processed *Leucaena leucocephala* (Lam. De Wit) seed meals in the diet of African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Middle-East J. Sci. Res.* 3:190–199.
- Steel, R. G. D. & J. H. Torie.** 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika. Suatu Pendekatan Biometrik*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Wang, G., R. Miskimins, & W. K. Miskimins.** 2000. Mimosine arrests cells in G1 by enhancing the levels of p27(Kip 1). *Exp. Cell Res.* 254:64–71.
- Xuan, T. D., A. A. Elzaawely, F. Deba, M. Fukuta, & S. Tawata.** 2006. Mimosine in *Leucaena* as a potent bio-herbicide. *Agron. Sustain. Dev.* 26:89–97.
- Yosef, E. & D. Ben-Ghedalia.** 2000. Changes in the alkaline-labile phenolic compounds of wheat straw cell walls as affected by SO₂ treatment and passage through the gastro-intestine of sheep. *J. Anim. Feed Sci. and Technol.* 83: 115–126.
- Yusran, M. A. & E. Teleni.** 2000. The effect of a mix of shrub legumes supplement on the reproductive performance of Peranakan Ongole cows on dryland smallholder farms in Indonesia. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* A 13 (Suppl.), 481.